

EFEITOS DA SINVASTATINA, DA EZETIMIBA E DA ASSOCIAÇÃO EZETIMIBA/SINVASTATINA SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATOS

Mariana Macedo Carmona (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Mellina da Silva Simões, Lívia Bracht (Orientador), e-mail: lbracht@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá /Centro Ciências Biológicas/ Maringá, PR.

Área e subárea do CNPq/CAPES: Ciências Biológicas / Bioquímica

Palavras-chave: estatinas, ezetimiba, cadeia transportadora de elétrons

Resumo

As estatinas inibem competitivamente a enzima HMG-CoA redutase. Estes fármacos podem ser utilizados em monoterapia ou em associação com outros fármacos que possuem mecanismos de ação complementares, como a ezetimiba, um inibidor da absorção do colesterol no intestino. Embora atuem de maneira segura, o uso desta associação pode causar efeitos adversos raros, como toxicidade hepática e muscular. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos crônicos da sinvastatina (40mg/Kg), ezetimiba (10mg/Kg) e associação ezetimiba/sinvastatina (10/40mg/Kg) sobre a função mitocondrial. Foram realizados experimentos com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos controle e ratos tratados durante 28 dias, onde notou-se um maior consumo de oxigênio nas mitocôndrias de animais tratados com sinvastatina e com a associação ezetimiba/sinvastatina. Não foram observadas alterações significativas nos valores do controle respiratório (RC) e na razão ADP/O. A avaliação da atividade das enzimas ligadas à membrana mitocondrial mostrou elevação na atividade dos complexos I, II e IV para o grupo sinvastatina e uma tendência a aumento na atividade dos complexos II e IV para o grupo associação. O tratamento com ezetimiba não alterou nenhum dos parâmetros analisados. Este trabalho é relevante no sentido de que esclarece sobre o funcionamento de mitocôndrias de fígado em animais tratados cronicamente com estes fármacos.

Introdução

As estatinas, medicamentos amplamente utilizados no tratamento de hipercolesterolemia, atuam como inibidores competitivos da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), que catalisa a redução de HMG-CoA a mevalonato, e, desse modo, reduzem os níveis séricos de colesterol. (TRISTANO; FULLER, 2006). As estatinas apresentam um mecanismo de ação relativamente seguro, já que os seus efeitos adversos associados são discretos e frequentemente transitórios. Entretanto, podem ser observados alguns efeitos adversos raros, mas clinicamente relevantes, como a toxicidade hepática e muscular (BAYS et al., 2014). Recentemente, em relação a esse aspecto, nosso grupo de pesquisadores demonstrou que o tratamento crônico de ratos com a associação ezetimiba/sinvastatina causou efeitos marcantes no metabolismo do fígado em perfusão (BRACHT et al., 2016). Tendo em vista a ampla utilização desses medicamentos no controle do colesterol e a escassez de estudos

investigando os efeitos do tratamento com estatinas e com a associação ezetimiba/sinvastatina (estudos *in vivo*) em mitocôndrias de fígado, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento crônico de ratos com a sinvastatina, a ezetimiba e a associação ezetimiba/sinvastatina sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de fígado.

Materiais e métodos

Durante os procedimentos experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250 g) mantidos em jejum de 12 horas e devidamente anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (parecer CEUA nº 1634270916). As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial (BRACHT; ISHII-IWAMOTO; SALGUEIRO-PAGADIGORIA, 2003). As velocidades de consumo de oxigênio de mitocôndrias rompidas e intactas foram determinadas através das inclinações obtidas dos registros de concentração *versus* tempo. Estas velocidades foram usadas para calcular o coeficiente de controle respiratório (RC) e a razão ADP/O (CHANCE; WILLIAMS, 1955). Succinato e α -cetogluturato foram usados como substratos e ADP foi adicionado nos tempos adequados apenas nas mitocôndrias intactas. Para medir a velocidade de consumo de oxigênio por mitocôndrias rompidas foram utilizados como substrato succinato, NADH e ascorbato mais tetrametil-p-fenileno-diamina dihidrocloro (TMPD).

Resultados e discussão

A figura 1 ilustra os resultados da respiração com o succinato, onde é possível observar um aumento significativo da velocidade de consumo de oxigênio nos estados II e IV para o grupo sinvastatina e no estado IV para o grupo associação ezetimiba/sinvastatina. Não houve diferença na velocidade de consumo de oxigênio do estado III entre os 4 grupos e nem alterações na respiração mitocondrial do grupo tratado com ezetimiba em relação ao controle.

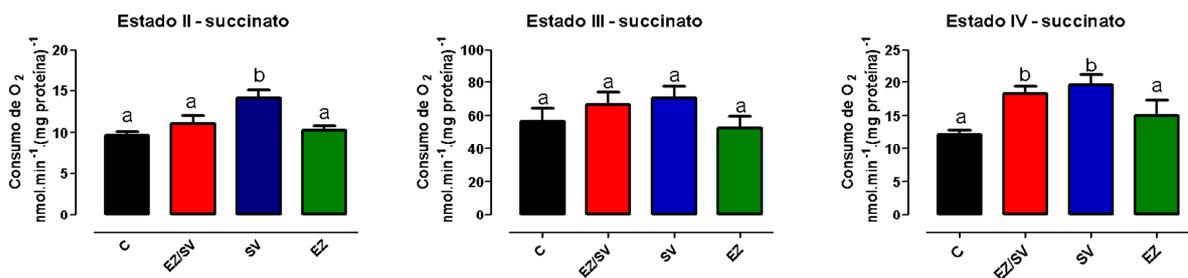


Figura 1: Respiração de mitocôndrias intactas de fígado de rato com o substrato succinato obtidas de animais controle (C) e tratados diariamente com a combinação ezetimiba/sinvastatina (EZ, 10/40 mg/Kg), a sinvastatina (SV, 40 mg/Kg) ou a ezetimiba (EZ, 10 mg/Kg) durante 28 dias por gavagem oral. Os resultados representam as médias \pm erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos para cada grupo. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, conforme análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Newman-Keuls.

Os resultados da respiração mitocondrial com alfa-cetogluturato estão ilustrados na figura 2. Com este substrato houve aumento significativo da respiração do estado III

(+48%) e IV (+52%) para o grupo de animais tratados com sinvastatina. Não foram observadas diferenças significativas na respiração do estado II entre os 4 grupos. Os tratamentos com ezetimiba e sinvastatina em monoterapia não afetaram nenhum parâmetro da respiração mitocondrial.

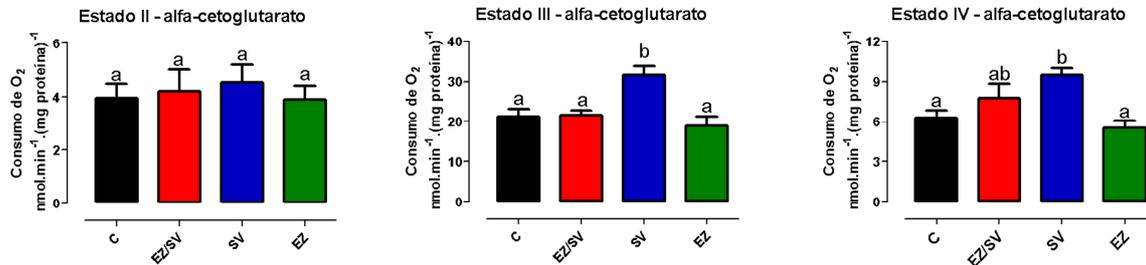


Figura 2: Respiração de mitocôndrias intactas de fígado de rato com o substrato alfa-cetogluturato obtidas de animais controle (C) e tratados diariamente com a combinação ezetimiba/sinvastatina (EZ, 10/40 mg/Kg), a sinvastatina (SV, 40 mg/Kg) ou a ezetimiba (EZ, 10 mg/Kg) durante 28 dias por gavagem oral. Os resultados representam as médias ± erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos para cada grupo. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, conforme análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Newman-Keuls.

Não foram observadas alterações significativas nos valores do controle respiratório (RC) e da razão ADP/O em mitocôndrias intactas de fígado de rato com os substratos succinato e alfa-cetogluturato (dados não mostrados).

A fim de verificar os efeitos do tratamento no transporte de elétrons para o complexo IV e corroborar os resultados obtidos com mitocôndrias intactas, a atividade das enzimas ligadas à membrana foi analisada e ilustrada na figura 3, onde foi constatado um aumento significativo de atividade nos complexos I, II e IV no grupo tratado com sinvastatina, quando utilizado NADH, succinato e TMPD como substratos respectivamente.

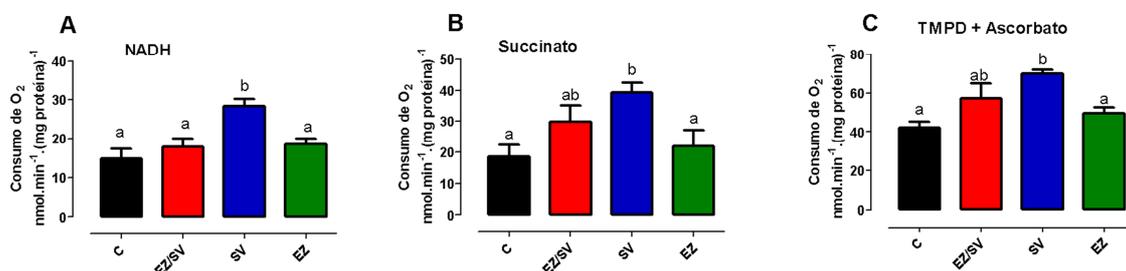


Figura 3: Atividade dos complexos mitocondriais I, II e IV em mitocôndrias rompidas de fígado de rato, obtidas de animais controles (C) e tratados diariamente com a combinação ezetimiba/sinvastatina (10/40 mg/Kg), a sinvastatina (40 mg/Kg) ou a ezetimiba (10 mg/Kg) durante 28 dias por gavagem oral. Painel A: Complexo I - NADH oxidase. Painel B: Complexo II - succinato oxidase. Painel C: Complexo IV - citocromo c oxidase. Os resultados representam as médias ± erro padrão da média (EPM) de 5 experimentos para cada grupo. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, conforme análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Newman-Keuls.

Os resultados obtidos neste trabalho explicam, ao menos em parte, o aumento observado no consumo de oxigênio em fígados isolados de animais tratados cronicamente com a associação ezetimiba/sinvastatina (10/40 mg/Kg), como previamente relatado por nossa equipe (BRACHT et al., 2016). No fígado em perfusão, o tratamento crônico com a associação ezetimiba/sinvastatina aumentou significativamente o consumo basal de oxigênio, sendo que este aumento não estava relacionado com um aumento na atividade de enzimas microssomais (P450) responsáveis pela metabolização destes fármacos. É provável que o aumento do consumo de oxigênio observado no fígado em perfusão seja decorrente da maior atividade das enzimas da cadeia respiratória, como demonstrado no presente trabalho.

Conclusões

O tratamento crônico de ratos com sinvastatina na dose de 40 mg/Kg promoveu aumento expressivo da respiração de mitocôndrias intactas e a atividade dos complexos multi enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons. A associação ezetimiba/sinvastatina (10/40 mg/Kg) também parece aumentar a respiração mitocondrial de ratos tratados cronicamente, embora em menor intensidade. O tratamento com ezetimiba mostrou-se inócua para o metabolismo mitocondrial hepático. Este trabalho é relevante no sentido de que esclarece sobre o funcionamento de mitocôndrias de fígado em animais tratados cronicamente com estes fármacos.

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo fomento e incentivo dados à pesquisa científica.

Referências

BAYS, H. et al. An assessment by the Statin Liver Safety Task Force: 2014 update. **Journal of clinical lipidology**, v. 8, n. 3 Suppl, p. S47–57, jan. 2014.

BRACHT, L. et al. Effect of the combination of ezetimibe and simvastatin on gluconeogenesis and oxygen consumption in the rat liver. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 118, n. 6, p. 415–420, 2016.

BRACHT, A., ISHII-IWAMOTO, E.L., SALGUEIRO-PAGADIGORIA, C.L. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal, in: Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E.L. (Eds.), **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Editora Manole, São Paulo, pp. 227-247, 2003.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. **The Journal of biological chemistry**, v. 217, n. 1, p. 383–93, 1955.

TRISTANO, A. G.; FULLER, K. Immunomodulatory effects of statins and autoimmune rheumatic diseases: novel intracellular mechanism involved. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 12, p. 1833–46, 5 dez. 2006.

